

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791858

研究課題名(和文)黄色ブドウ球菌点眼ワクチンの開発

研究課題名(英文)Development of vaccine eye drop against Staphylococcus aureus

研究代表者

鈴木 崇 (Suzuki, Takashi)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70398048

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：眼部から検出されたMRSAには、ST764が存在しており、さらに解析を行うとST764には病原因子抑制遺伝子であるpsm-mecIに変異を認め、病原性が高くなっていた。また、黄色ブドウ球菌の細胞壁の構成成分であるWall teichoic acids (WTA)は、角膜炎における重要な病原因子であり、WTAを抑制することで感染を抑制できる可能性を明らかにした。さらに、WTA阻害薬を発見するスクリーニング方法を開発し、実際候補となる薬剤を発見した。

研究成果の概要(英文)：ST764 were the most frequently identified sequence types in MRSA strains from ocular site. ST764 has a mutation in psm-mecI which regulates virulence factors, and increase virulence.

Wall teichoic acids (WTAs) which are major polyanionic polymer components the cell wall of Staphylococcus aureus, plays a critical role in keratitis, and WTA appears to be a viable target for treating S. aureus infection. We developed screening methods for WTA inhibitors, and found some candidates.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、眼科学

キーワード：黄色ブドウ球菌 タイコ酸 MRSA ワクチン 遺伝子 病原因子

1. 研究開始当初の背景

黄色ブドウ球菌は、皮膚や粘膜の常在細菌であるが、時に、皮膚や軟部組織の感染を引き起こすだけでなく、高齢者、小児、免疫不全状態患者においては、敗血症などの深部感染症も引き起こし、時に致死的状态に追い込む場合がある。黄色ブドウ球菌による感染症に対する治療としては、原因株に対して、感受性の高い抗菌薬の投与が必須である。従来、黄色ブドウ球菌に対してセフェム系、ペニシリン系薬剤は感受性が高く、治療薬として使用されていたが、近年、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)の出現により、セフェム系、ペニシリン系抗菌薬に対して、耐性を示し、治療に抵抗をしめす症例も増加した。MRSAによる敗血症による死亡者数は、米国で年間18650人という報告(Klevens, R. M., et al, JAMA, 298, 1763-71, 2007)もあり、治療が難しい感染症であることがうかがわれる。MRSAは、医療現場において、抗菌薬の乱用により、耐性を獲得し、また、医療機器や医療従事者を介して伝播するため、院内感染菌として考えられ、社会的にも問題になっている。一方、院内のみでなく、市中においてMRSAに感染する場合も散見され、市中感染菌としても注意が必要である。一般的にはMRSAに対して、感受性を示す薬剤として、バンコマイシン、アルベカシン、テイコプラニンがあるが、移行性や副作用の問題で効果を発揮できない場合も少なくない。また、バンコマイシン耐性の黄色ブドウ球菌が米国で検出されており(Chang, S., et al, N Engl J Med 348:1342-7, 2003)、バンコマイシン耐性の拡大が危惧される。眼科領域においてもMRSAによる眼感染症は問題であり、現在バンコマイシンの局所薬が治療に用いられているが、バンコマイシン耐性株が出現すれば治療が難渋を示す可能性は高い。そのため、黄色ブドウ球菌に対する新しい予防や治療を開発する必要がある。

黄色ブドウ球菌の細胞壁の構造は、重合化したペプチドグリカンのほかに、ペプチドグリカンの間を架橋しているタイコ酸や菌の接着に重要な細胞表面タンパクが存在する。タイコ酸は、陰性電荷をもつ、糖鎖で構成され、細胞壁質量の30~60%を占めていることで細胞壁の堅固性を維持している。タイコ酸はその成分から、**Wall teichoic acids(WTA)**とLipoteichoic acids(LTA)に分類されている。WTAは細胞壁の表層に存在し、細菌のヒト細胞への接着に関与し、さらには病原性に寄与することが明らかになった。(Weidenmaier, C., et al Nat Med 10:243-5, 2004)

黄色ブドウ球菌の細胞壁に存在するWTAや細胞表面蛋白は宿主の細胞が抗原として認識する可能性がありこれらを標的としたワクチンの開発が進んでいる。(Broughan, J., et al Expert Rev Vaccines.10:695-708.2011) また、WTAや細胞表面蛋白を制御することで、菌の病原性を低下させる可能性もあり、今後の新しい標的として期待できる。特に眼科領域では、点眼というDrug Deliveryを使用することでより直接的に効果を見ることができると、臨床応用しやすい

2. 研究の目的

眼科領域において、感染症予防としては抗菌薬点眼が主流であるが、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌などの耐性菌の出現を促す恐れもある。本研究の目的は、眼科領域から検出される黄色ブドウ球菌を解析し、眼感染症において重要な病原因子を明らかにし、さらにその病原因子を標的としたワクチンや病原因子抑制剤を開発し、その感染症予防効果についての臨床的意義を探索することである。

3. 研究の方法

1) 眼部由来黄色ブドウ球菌の解析

健常な結膜嚢もしくは角膜炎から検出された30株の黄色ブドウ球菌[MRSA; 11株、メチシリン感受性黄色ブドウ球菌(MSSA)19株]に対して、DNAを抽出し、その後MLST(Multi Locus Sequence Typing)法を用いて遺伝子解析を行った。MLST法は、菌株ごとに複数遺伝子の配列の差異をパターン化・データベース化して、未知の株を解析することで、Sequence Type(ST)を同定・分類することができる。そのため、菌株の由来や特徴を確実に、詳細に知ることが可能である。

2) 黄色ブドウ球菌の角膜炎における病原因子の解析

眼科特有の株が認められる場合は、病原因子の検索を微生物学的に検討し、標的となる病原因子を欠失させた株をもちいて、角膜上皮細胞への毒性、接着率、また、マウス黄色ブドウ球菌角膜炎モデルにおける病態の違いを検討することで、眼感染症の病原因子の役割を考察する。

3) 病原因子阻害剤のスクリーニング

病原因子阻害剤のスクリーニング方法を開発し、その方法を用いて病原因子阻害剤を発見する。

4. 研究成果

1) 眼部由来黄色ブドウ球菌の解析

臨床分離株をMLST法で解析したところ、MRSAでは、院内感染型MRSAの遺伝子型であるST5に加えて、ST5の変異型であるST764が多く検出された。一方、MSSAではST8, ST183の遺伝子型が検出された(図1)。

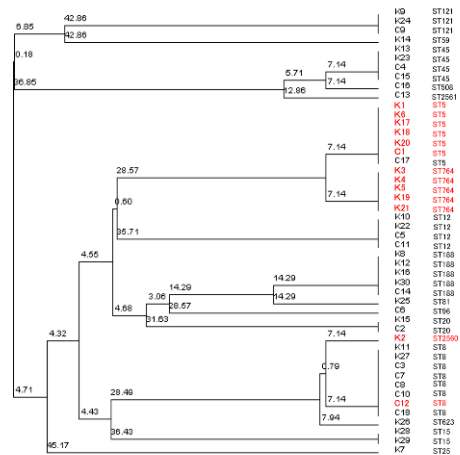


図1 黄色ブドウ球菌のMLST解析(赤字がMRSA,黒字がMSSA)

さらに眼科由来のMRSAにおけるST764の病原性等を確認した。院内感染型MRSAには、*psm⁻*などの毒素を抑制する遺伝子群(*psm⁻mec*)が存在することが、明らかになっているが、ST764の解析を行ったところ、*psm⁻mec*の遺伝子に変異を認めることで、毒素産生が抑制されておらず、病原性が高いことを示した。

2) 黄色ブドウ球菌の角膜炎における病原因子の解析

*psm⁻*が角膜炎に対してどのような役割を担っているかを明らかにするために、黄色ブドウ球菌(野生株)と*psm⁻*欠失株を用いて、培養角膜上皮への影響を調べたところ、野生株に比較して*psm⁻*欠失株は培養角膜上皮に有意に接着する一方、細胞への毒性は減弱していることが確認できた。このことは*psm⁻*が、角膜炎における重要な病原因子であることを示唆している。すなわち、眼部由来のMRSAは*psm⁻mec*が変異することで角膜に障害を与える*psm⁻*を産生していることを意味している。一方、*psm⁻*に対する宿主側の免疫反応などは確認できておらず*psm⁻*に対する抗体などが、感染症成立を抑制できるか、また、将来的にワクチンとして使用できるか、現在検討中である。

別の治療標的となるWTAの角膜炎モデルにおける役割を検討するため、黄色ブドウ球菌野生株とWTA欠失株(Δ TarO, Δ DltA)をマウス角膜に接種したところ、接種後48時間の角膜内の菌量はWTA欠失株で減少しており、臨床像も軽快していた(図2)。このことは、WTAが角膜炎における重要な病原因子である可能性が高い。また、培養角膜上皮への接着や侵入もWTA欠失株では野生株よりも抑制されていることより、WTAを抑制することで、黄色ブドウ球菌の角膜炎の発症を予防できる可能性が高いことが明らかになった。

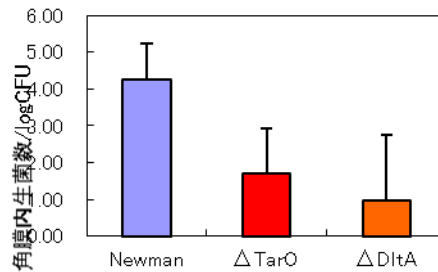


図2 接種48時間後のマウス角膜内菌量

3) 病原因子阻害剤のスクリーニング
WTA阻害薬を発見するために、スクリーニング法を開発した。まず、アゾ染料であるCongo redはWTA欠失株にのみ殺菌的に働くことを発見した(図3)。

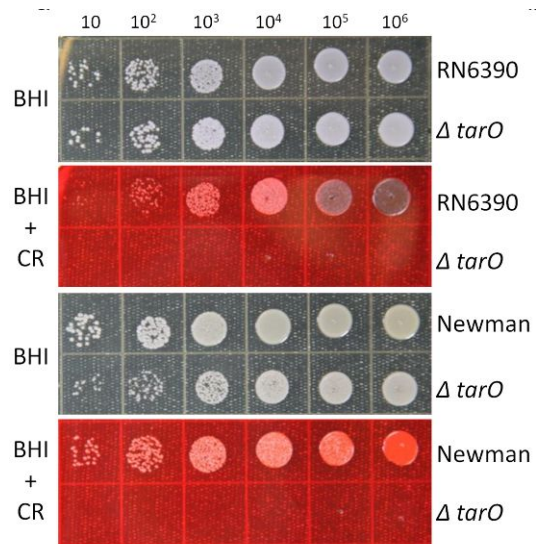


図3 Congo-red含有培地上のWTA欠失株の生育

その原理を利用して、放線菌から抽出された蛋白ライブラリーの中で、Congo redと併用した時にのみ黄色ブドウ球菌を殺菌できる物質をスクリーニングすることでWTA阻害剤を探索した。その結果、いくつかの候補が見つかり、現在WTA阻害の作用機序の解明や臨床応用可能か動物モデルを使用した効果の検討を予定している。本研究では、眼部から検出された黄色ブドウ球菌の特徴や病原因子を明らかにし、さらに、ワクチンの候補になりうる物質を見つけた。また、病原因子であるWTAの角膜炎への重要性を明らかにし、WTA阻害剤も発見することができた。WTA阻害剤を使用することで、黄色ブドウ球菌を殺すのではなく、角膜や結膜に接着できないようにすることで感染症を予防することが可能ではないかと考えており、今後さらに検討を続ける予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 18 件)

1. Yamaguchi S, **Suzuki T**, Kobayashi T, Oka N, Ishikawa E, Shinomiya H, Ohashi Y. Genotypic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from ocular infection. *J Infect Chemother*. In press. 査読有
2. Mochizuki Y, **Suzuki T**, Oka N, Zhang Y, Hayashi Y, Hayashi N, Gotoh N, Ohashi Y. *Pseudomonas aeruginosa* MucD protease mediates keratitis by inhibiting neutrophil recruitment and promoting bacterial survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 55:240-6, 2014 査読有
3. Hayashi S, **Suzuki T**, Yamaguchi S, Inoue T, Ohashi Y. Genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of keratitis and healthy conjunctival sacs. *Cornea*. 33:72-6, 2014 査読有
4. Uda T, **Suzuki T**, Mitani A, Tasaka Y, Kawasaki S, Mito T, Ohashi Y. Ocular Penetration and Efficacy of Levofloxacin Using Different Drug-Delivery Techniques for the Prevention of Endophthalmitis in Rabbit Eyes with Posterior Capsule Rupture. *J Ocul Pharmacol Ther*. 30:333-339, 2014 査読有
5. Tasaka Y, **Suzuki T**, Kawasaki S, Uda T, Mito T, Uno T, Ohashi Y. Moxifloxacin as Postoperative Prophylaxis for *Enterococcus faecalis*-Induced Endophthalmitis After Cataract Surgery in Aphakic Rabbits. *J Ocul Pharmacol Ther*. 29:403-9, 2013 査読有
6. **Suzuki T**, Ohashi Y. Combination effect of antibiotics against bacteria isolated from keratitis using fractional inhibitory concentration index. *Cornea*. 32:e156-60, 2013 査読有
7. **Suzuki T**, Tanaka H, Toriyama K, Okamoto S, Urabe K, Hashida M, Shinkai Y, Ohashi Y. Prospective clinical evaluation of 1.5% levofloxacin ophthalmic solution in ophthalmic perioperative disinfection. *J Ocul Pharmacol Ther*. 29:887-92, 2013 査読有
8. Tasaka Y, Minami N, **Suzuki T**, Kawasaki S, Zheng X, Shiraishi A, Uno T, Miyake K, Ohashi Y. New side-view imaging technique for observing posterior chamber structures during cataract surgery in porcine eyes. *BMC Ophthalmol*. 13:47, 2013 査読有
9. Ishikawa E, **Suzuki T**, Yamaguchi S, Inoue T, Uno T, Ohashi Y. Serrated Margins in *Pseudomonas aeruginosa* Keratitis. *Case Rep Ophthalmol*. 4:12-5, 2013 査読有
10. Joko T, **Suzuki T**, Inoue T, Kikuchi M, Hara Y, Shiraishi A, Ohashi Y. Coincidence of Varicella-Zoster Virus Anterior Uveitis in a Patient with Chandler's Syndrome. *Case Rep Ophthalmol*. 4:274-8, 2013 査読有
11. **Suzuki T**, Kitagawa Y, Maruyama Y, Yamaguchi S, Sakane Y, Miyamoto H, Ohashi Y. Conjunctivitis caused by *Neisseria gonorrhoeae* isolates with reduced cephalosporin susceptibility and multidrug resistance. *J Clin Microbiol*. 51:4246-8, 2013 査読有
12. Nakayama J, Yokohata R, Sato M, **Suzuki T**, Matsufuji T, Nishiguchi K, Kawai T, Yamanaka Y, Nagata K, Tanokura M, Sonomoto K. Development of a Peptide Antagonist against *fsr* Quorum Sensing of *Enterococcus faecalis*. *ACS Chem Biol*. 8:804-11, 2013 査読有
13. Toriyama K, Inoue T, **Suzuki T**,

- Higashiura R, Maeda N, Ohashi Y. Spontaneous Bleb Formation in a Presumed Pellucid Marginal Corneal Degeneration With Acute Hydrops. *Cornea*. 32:839-41, 2013 査読有
14. **Suzuki T**, Campbell J, Kim Y, Swoboda JG, Mylonakis E, Walker S, Gilmore MS Wall teichoic acid protects *Staphylococcus aureus* from inhibition by Congo red and other dyes. *J Antimicrob Chemother*. 67:2143-51, 2012 査読有
 15. Mito T, **Suzuki T**, Kobayashi T, Zheng X, Hayashi Y, Shiraishi A, Ohashi Y. Effect of photodynamic therapy with methylene blue on *Acanthamoeba* in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 53:6305-13, 2012 査読有
 16. Kobayashi T, Mito T, Watanabe N, **Suzuki T**, Shiraishi A, Ohashi Y. Use of 5-cyano-2,3-ditolyl-tetrazolium chloride staining as an indicator of biocidal activity in a rapid assay for anti-*Acanthamoeba* agents. *J Clin Microbiol*. 50:1606-12, 2012 査読有
 17. Toriyama K, **Suzuki T**, Hara Y, Ohashi Y. Cytomegalovirus retinitis after multiple ocular surgeries in an immunocompetent patient. *Case Report Ophthalmol*. 3:356-9, 2012 査読有
 18. Inoue T, Kawashima R, **Suzuki T**, Ohashi Y. Real-time polymerase chain reaction for diagnosing acyclovir-resistant herpetic keratitis based on changes in viral DNA copy number before and after treatment. *Arch Ophthalmol*. 130:1462-4, 2012 査読有
- 〔学会発表〕(計 8 件)
1. **T. Suzuki**. Developing new treatments for infectious keratitis. APAO-AIOS 2013 Hyderabad India, January 17th-20th, 2013
 2. **T. Suzuki**. The evaluation of antibiotics in the prophylaxis or treatment of endophthalmitis using animal model. Korean Ophthalmological Society 2012, Seoul Korea, November 4th-5th, 2012
 3. M. Arisa, **T.Suzuki**, Y. Hiramatsu, Y.Tasaka, T.Uda, S. Kawasaki, Y.Ohashi . Interaction between ophthalmic viscosurgical device and intraocular lens. ESCRS 2012, Milan Italia, September 8th-12th, 2012
 4. T.Uda, M.Arisa, Y.Tasaka, S.Kawasaki, **T.Suzuki**, Y.Ohashi . Visualization of the fluid dynamics under the intraocular lens in irrigation and aspiration. ESCRS 2012, Milan Italia, September 8th-12th, 2012
 5. **T. Suzuki**, K.Toriyama, S. Okamoto, H.Tanaka, K.Urabe, M.Hashida , Y.Shinkai, Y.Ohashi. Clinical evaluation of 1.5% Levofloxacin (LVFX) ophthalmic solution in ophthalmic perioperative disinfection. ESCRS 2012, Milan Italia, September 8th-12th, 2012
 6. **T. Suzuki**, S Hayashi. Y Ohashi. Genotypic Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from Eyes with Keratitis. ARVO 2012, FortLauderdale U.S., May 6th-9th, 2012
 7. T. Mito, **T.Suzuki**, T. Kobayashi, A. Shiraishi, Y. Ohashi. Effect of photodynamic therapy with methylene blue against *Acanthamoeba* In Vitro. ARVO 2012, FortLauderdale U.S., May 6th-9th, 2012
 8. **T. Suzuki**. Performance of conventional and new methods for the detection of pathogens in ocular infections. Frontiers in Ocular infection, Lunch symposium at APAO 2012 Busan Korea, April 14th, 2012
- 〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 崇 (Suzuki, Takashi)

愛媛大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：70398048

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし